

Y.S.CHANG & ASSOCIATES

K.P.O.BOX 136, SEOUL 110, KOREA



Member : AIPPI ARPA & LES
Fax : (82-2) 556-5377/5969
Phone : 556-8225-6, 568-0461
E-MAIL : yschang@yschang.co.kr



FILE COPY

提出書類写本

Kind of Protection : Patent

Applicant : Novozymes A/S

Title : Lipase Variant

Encl	Document filed	Filing Date	Kor. Appln. No.
X	Application 出願書	September 24, 2001	2001-7012115
	Petition for Exam 出願審査請求書		
X	Power of Attorney 委任狀	"	"
	Priority Document 優先権主張書類		
	Argument 意見書		
	Amendment 補正書		
	Printed Matter 審査参考資料		
	Trial 審判請求書		
Your Ref. No.		5854.204-KR	
Our Ref. No.		DK-01P-0848	

Y.S.CHANG 合同特許法律事務所
韩国Seoul光化門郵局私書函136号

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0239502

32

TRANSLATION

Please be advised that the following Application Number has been assigned to this case by the Korean Intellectual Property Office :

NOTICE OF APPLICATION NUMBER

To : Jinsang Jeong
Appln. Date : March 30, 2000 Appl. No. : 10-2001-7012115
Filing Date of the Translation : September 24, 2001 Int'l Appln. No. : PCT/DK2000/00156
Remarks : Request for Exam. (yes, no)
Request for Early Laying-Open (yes, no)
Serial No. (1)
Applicant : Novozymes A/S

Commissioner
Korean Intellectual Property Office

수신 : 서울 강남구 역삼동 726번지 아세아빌딩
7층(와이.에스.장 합동특허법률사무소)
정진상 귀하

135-719

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2001.09.24(국제출원일자 : 2000.03.30)
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(0001)
출원번호 10-2001-7012115 (접수번호 1-1-01-0244093-18)
국제출원번호 PCT/DK2000/00156
출원인 성명 노보자임스 에이/에스 (5-2000-057136-1)

특 허 청 장

TRANSLATION

[Document] PAPERS Pursuant to Articles 201 and 203 of the KOREAN PATENT LAW

[Kind of Intellectual property right] Patent

[To] Korean Intellectual Property Office

[Serial No.] 1

[Filing Date] September 24, 2001

[IPC] C12N 9/20

[IPC] C11D 3/386

[Title of Invention] Lipase Variant

[Applicant]

[Name] Novozymes A/S

[Code No.] 5-2000-057136-1

[Attorney]

[Name] J. S. Jeong

[Code No.] 9-1998-000519-0

[General Power of Attorney Registration No.] 2001-034547-7

[Attorney]

[Name] J. H. Park

[Code No.] 9-2000-000056-3

[General Power of Attorney Registration No.] 2000-071673-5

[Inventor]

[Name] Jesper VIND

[Address] Bagsværdvej 115, DK-2800 Lyngby, Denmark

[Nationality] DK

[Inventor]

[Name] Allan SVENDSEN

[Address] Bakkeledet 28, DK-3460 Birkerød, Denmark

[Nationality] DK

[Inventor]

[Name] Shamkant Anant PATEKAR

[Address] Christoffers Allé 91, DK-2800 Lyngby, Denmark

[Nationality] DK

[Inventor]

[Name] Kim Vilbour ANDERSEN

[Address] Tåsingegade 31 4.th, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

[Nationality] DK

[Inventor]

[Name] Dorte Aaby HALKIER

[Address] Hestkøbvej 11E, DK-3460 Birkerød, Denmark

[Nationality] DK

TRANSLATION

[Inventor]

[Name] Kirsten BOJSEN

[Address] Bakkedal 5, DK-2900 Hellerup, Denmark

[Nationality] DK

[International Application]

[Int'l Appln. No.] PCT/DK2000/00156

[Int'l Filing Date] March 30, 2000

[Priority Claim]

[Country] DK

[Kind of Appln.] Patent

[Appln. No.] PA 1999 00441

[Filing Date] March 31, 1999

[Certified Document] Not Attached

[Priority Claim]

[Country] US

[Kind of Appln.] Patent

[Appln. No.] 60/128,933

[Filing Date] April 13, 1999

[Certified Document] Not Attached

[Purport] We are filing this application as above pursuant to Articles 201 and 203 of the Patent Law.

Attorney

J. S. Jeong

Attorney

J. H. Park

[Official Filing Charges]

[Basic Fee]	20 pages	₩29,000
---------------	----------	---------

[Additional Fee]

[Priority Claiming Fee]	Priority Application : 2 cases	₩43,000
---------------------------	--------------------------------	---------

[Request for Exam. Fee]

[Total]	₩72,000
-----------	---------

[Designated States]

[AP] GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

[EA] AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

[EP] AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

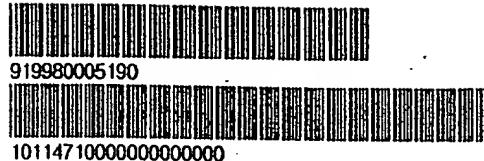
[OA] BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

[National Patent] AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

TRANSLATION

[Attached Documents]

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1. Written translations of Specification, Claims, Abstract and Drawings under Art. 201
of the Korean Patent Law | 1 copy |
| 2. Power of Attorney (Quoted the General Power of Attorney) | 1 copy |
| 3. Translations of Priority Documents (will be filed) | 2 copies |
| 4. Copy of Notification of the Recording of a Change | 1 copy |



방 식 심 사 관	당 당	심 사 관

【서류명】 특허법 제201조 및 제203조의 규정에 의한 서면

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2001.09.24

【국제특허분류】 C12N 9/20

【국제특허분류】 C11D 3/386

【발명의 국문명칭】 리파제 변이체

【발명의 영문명칭】 LIPASE VARIANT

【출원인】

【명칭】 노보자임스 에이/에스

【출원인코드】 5-2000-057136-1

【대리인】

【성명】 정진상

【대리인코드】 9-1998-000519-0

【포괄위임등록번호】 2001-034547-7

【대리인】

【성명】 박종혁

【대리인코드】 9-2000-000056-3

【포괄위임등록번호】 2000-071673-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 빈트 예스퍼

【성명의 영문표기】 VIND, Jesper

【주소】 덴마크 디케이-2800 링비 박스바에르트베이 115

【국적】 DK

【발명자】

【성명의 국문표기】 스벤드젠 알란

【성명의 영문표기】 SVENSEN, Allan

【주소】 덴마크 디케이-3460 비르케뢰드 바크캐래데트 28

【국적】 OK

【발명자】

【성명의 국문표기】 파트카르 샹칸트 아난트

【성명의 영문표기】 PATKAR, Shamkant Anant

【주소】 덴마크 디케이-2800 링비 크리스토퍼스 알레 91

【국적】 OK

【발명자】

【성명의 국문표기】 안데르센 킹 빌보르

【성명의 영문표기】 ANDERSEN, Kim Vilbour

【주소】 덴마크 디케이-2100 코펜하겐 외 4.티에이취 탄신게가데 31

【국적】 OK

【발명자】

【성명의 국문표기】 할키어 도르테 아비

【성명의 영문표기】 HALKIER, Dorte Aaby

【주소】 덴마크 디케이-3460 비르케뢰트 헤스트콰브베이 110

【국적】 OK

【발명자】

【성명의 국문표기】 보아젠 키르스텐

【성명의 영문표기】 BOJSEN, Kirsten

【주소】 덴마크 디케이-2900 헬레르업 바크캐달 5

【국적】 OK

【국제출원의 표시】

【국제출원번호】 PCT/DK2000/00156

【국제출원일자】 2000.03.30

【우선권주장】

【출원국명】 DK

【출원종류】 특허

【출원번호】 PA 1999-00441

【출원일자】 1999.03.31

【증명서류】 미첨부

【우선권주장】

【출원국명】 US

【출원종류】 특허

【출원번호】 60/128,933

【출원일자】 1999.04.13

【증명서류】 미첨부

【취지】 특허법 제201조 및 203조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

대리인

정진상 (인)

대리인

박종혁 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	2	건	43,000	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】			72,000	원

【지정국현황】

【AP】 GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

【EA】 AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

【EP】 AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

【OA】 BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

【국가특허】 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP,

KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,
RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,
ZW

- 【첨부서류】
- 1.특허법 제201조의 규정에 의한 명세서·청구의 범위·요약서 및 도
면의 번역문_1통
 - 2.위임장_1통[포괄위임장 원용]
 - 3.우선권증명서류 및 동 번역문_2통[추후제출]
 - 4.기타첨부서류_1통[출원인명칭변경신고서]

【명세서】

【발명의 명칭】

리파제 변이체{LIPASE VARIANT}

【기술분야】

본 발명은 세제 조성물에의 사용에 적합한 리파제 변이체에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 제 1 급의 세척 효과를 보이는 *Humicola lanuginosa* 균주 DSM 4109 의 야생형 리파제의 변이체에 관한 것이다.

【배경기술】

수 년 동안, 리파제는 의복 및 다른 직물로부터 지질 또는 지방 얼룩을 제거하기 위한 세제 효소로서 사용되어왔고, 구체적으로는 *Humicola lanuginosa* 유래형 리파제(EP 258 068 및 EP 305 216)가 상표명 Lipolase ®(Novo Nordisk A/S 의 제품)로 판매된다.

WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079 및 WO 97/07202 는 세제 용도용의 개선된 성질을 가지는 *H. lanuginosa* 리파제의 변이체를 개시한다. 그러므로, WO 97/04079 는 N-말단 및/또는 C-말단에 웨티드 첨가(확장)가 있는 변이체를 개시한다. WO 97/07202 는 1 회의 세척으로 라드 얼룩진 견본에서 상당한 양의 라드를 제거할 수 있는 "제 1 급의 세척 성능"을 가진 리파제 변이체를 개시한다.

다양한 상업적 세제로서 개선된 세척 성능을 가지는 신규한 리파제 제공에 대한 요구가 여전히 존재한다. 본 발명은 이러한 신규한 리파제에 관한 것이다.

(발명의 개요)

본 발명자는 리포라제(야생형 *Humicola lanuginosa* 리파제)의 어떤 변이체가 세제 용액에서 특히 양호한 제 1 급-세척 성능을 가진다는 것을 발견했다. 더욱이, 리파제는 순백 유지 및 더러움 제거와 같은 추가적인 잇점을 제공할 수 있다.

본 발명자는 변이체가 3 차원 구조에서 N-말단 근처에 양성 아미노산으로의 하나 이상의 치환을 포함해야만 한다는 것을 발견했다. 더욱이, 변이체는 C-말단에서 펩티드 첨가를 포함해야만 하고/또는 위치 90-101 및 210에서 전기적으로 하전된 아미노산에 대한 어떤 제한을 충족해야만 한다.

따라서, 본 발명은

- a) *Humicola lanuginosa* 균주 DSM 4109로부터 유래된 야생형 리파제와 적어도 90 % 동일성을 가지고;
- b) 야생형 리파제와 비교할 때, E1 또는 Q249의 15 Å의 범위내에서 3 차원 구조의 표면상에 전기적으로 중성 또는 음으로 하전된 아미노산을 양으로 하전된 아미노산으로의 치환을 포함하며;
- c) C-말단에 펩티드 첨가를 포함하며; 및/또는
- d) 하기의 제한:
 - i) 상기 야생형 리파제의 위치 E210에서 음성 아미노산을 포함하는 것;
 - ii) 상기 야생형 리파제의 위치 90-101에 해당하는 영역에서 음으로 하전된 아미노산을 포함하는 것;
 - iii) 상기 야생형 리파제의 N94에 해당하는 위치에서 중성 또는 음성 아미-

노산을 포함하고 및/또는 상기 야생형 리파제의 위치 90-101에 해당하는 영역에서 음성 또는 중성 순전하를 가지는 것을 충족시키는 아미노산 서열을 가지는 리파제 폴리펩티드를 제공한다.

【발명의 상세한 설명】

Humicola lanuginosa 리파제

본 발명에 사용된 기준 리파제는 *Humicola lanuginosa* 균주 DSM 4109로부터 유래된 야생형 리파제이다. EP 258 068 및 EP 305 216에 개시되며, US 5,869,438의 SEQ ID NO:2의 위치 1-269로 보여진 아미노산 서열을 가진다. 본 명세서에서, 기준 리파제는 또한 리포라제라고 말한다.

양성 아미노산으로의 치환

본 발명의 리파제는 E1 또는 Q249 근처의 전기적으로 중성 또는 음으로 하전된 아미노산의 양으로 하전된 아미노산, 바람직하게는 R로의 하나 이상의 치환(예를 들어, 2-4, 특히 2)을 포함한다.

치환은 예를 들어, 어떤 위치 1-11, 90, 95, 169, 171-175, 192-211, 213-226, 228-258, 260-262에서 E1 또는 Q249의 15 Å 내의 3 차원 구조의 표면상이다.

치환은 예를 들어, 어떤 위치 1-7, 10, 175, 195, 197-202, 204-206, 209, 215, 219-224, 230-239, 242-254에서 E1 또는 Q249의 10 Å 내일 수 있다.

치환은 예를 들어, 어떤 위치 1-11, 169, 171, 192-199, 217-225, 228-240, 243-247, 249, 261-262에서 E1의 15 Å 내일 수 있다.

치환은 예를 들어, 어떤 위치 1-7, 10, 219-224 및 230-239에서 E1의 10
A내인 것이 가장 바람직하다.

그러므로, 어떤 바람직한 치환은 S3R, S224R, P229R, T231R, N233R, D234R
및 T244R이다.

C-말단에 펩티드 첨가

리파제는 C-말단 L269에 부착된 펩티드 첨가를 포함할 수 있다. 펩티드 첨
가는 다양한 세제에서 제 1 급의 세척 성능을 향상시킨다.

펩티드 첨가는 바람직하게는 예를 들어, 2, 3, 또는 4 아미노산과 같은 1-5
개의 아미노산으로 구성된다. 펩티드 첨가의 아미노산은 270, 271 등으로 넘버링될
것이다.

펩티드 첨가는 예를 들어, PGL 또는 PG와 같은 전기적으로 중성(예를 들어,
소수성) 아미노산으로 구성될 수 있다. 선택적인 구체예에서, 리파제 펩티드 첨가
는 중성(예를 들어, 소수성) 아미노산 및 아미노산 C로 구성되며, 리파제는 펩티
드 첨가의 C와 이황화 결합을 형성하기 위해서 적당한 위치에서 C로 치환된 아미
노산을 포함한다. 실시예는;

G23C 또는 T37C에 결합된 270 C

K24C, T37C, N26C 또는 R81 C에 결합된 271 C

D27C, T35C, E56C, T64C 또는 R81 C에 결합된 272 C.

위치 90-101 및 210의 아미노산

본 발명의 리파제는 바람직하게는 위치 90-101 및 210에서 전기적으로 하전

된 아미노산에 대한 어떤 제한을 충족시킨다. 전하 제한을 충족하는 리파제는 높은 음이온 함량을 가지는 세제에 특히 효과적이다.

그러므로, 아미노산 210 은 음성일 수 있다. E210 은 비변형이거나, 치환 E210D/C/Y, 특히 E210D 를 가질 수 있다.

리파제는 예를 들어, 위치 D96 및/또는 E99 와 같이, 어떤 위치 90-101(구체적으로 94-101)에서 음으로 하전된 아미노산을 포함할 수 있다.

더욱이, 리파제는 예를 들어, N94N/D/E 와 같은 위치 N94, 즉 N94(중성 또는 음성)에서 중성 또는 음성 아미노산을 포함할 수 있다.

또한, 리파제는 영역 90-101 에서 음성 아미노산의 수는 양성 아미노산의 수 이상인 음성 또는 중성 순 전하를 가질 수 있다. 그러므로, 영역은 2 개의 음성 아미노산(D96 및 E99) 및 1 개의 양성(K98) 아미노산을 가지고 위치 94(N94)에서 중성 아미노산을 가지는 리포라체와 다르지 않거나, 영역은 하나 이상의 치환으로 변형될 수 있다.

택일적으로, 아미노산 N94, N96 및 E99 중 2 개는 음성 또는 본래의 전하를 가질 수 있다. 그러므로, 모든 3 개의 아미노산이 불변일 수 있고, 보존적 또는 음성 치환, 즉 N94(중성 또는 음성), D(음성) 및 E99(음성)로 변형될 수 있다. 예는 ND94D/E 및 D96E 이다. 또한 3 개중의 하나는 치환되어서 전하 즉, N94(양성), D96(중성 또는 양성) 또는 E99(중성 또는 양성)를 증가시킬 수 있다. 예는 N94K/R, D96I/L/N/S/W 또는 E99N/Q/K/R/H 이다.

중성 아미노산의 음성 아미노산(N94D/E)으로의 치환은 음이온 세제의 성능을

개선시킬 수 있다. 중성 아미노산의 양성 아미노산(N94K/R)으로의 치환은 음이온 세제 및 음이온/비-이온 세제(예를 들어, 총 계면활성제의 40-70 % 음이온을 가지는 세제) 모두에서 양호한 성능을 가지는 변이체 리파제를 제공할 수 있다.

다른 위치에서의 아미노산

본 발명자는 치환 Q249R/K/H 는 음이온 및 음이온/비이온 세제 모두에서 성능을 개선할 수 있고, R209 의 중성 또는 음성 아미노산 (예를 들어, R209P/S)으로의 치환은 음이온 세제의 성능을 개선시킬 수 있다는 것을 발견했다. 리파제는 선택적으로 치환 G91A 를 포함 할 수 있다.

리파제는 선택적으로 하나 이상의 추가적인 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 예를 들어, WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079 및 WO 97/07202에 개시된 치환과 같이 당업계에 공지된 원칙에 따라 이루어질수 있다.

치환의 조합

제 1 급의 세척 성능을 가지는 리파제 변이체는 하기와 같이 리포라제를 변형시킴으로써 얻을 수 있다. 대응물의 치환은 선택적이다.

T231R+N233R
N94K+D96L+T231R+N233R+Q249R+270P+271G+272L
D96L+T231R+N233R
G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R
(N33Q)+D96L+T231R+N233R+Q249R+270 PGL
R209P+T231R+N233R
(N33Q)+E99N+N101S+T231R+N233R+Q249R+270 PGL
K24C+(N33Q)+D96S+T231R+N233R+Q249R+270 PCL
(N33Q)+G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270 PGL
E1A+(N33Q)+G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+270 PGL
(N33Q)+G91A+E99K+G255R+T231R+N233R+Q249R+270 PGL
(N33Q)+G91A+E99K+T231R+N233R+T244R+Q249R+270 PGL

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
E87K +G91D +D96L +G225P +T231R +N233R +Q249R +N251D
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270AGVF
G91A +E99K +T189G +T231R +N233R +Q249R
D102G +T231R +N233R +Q249R
T231R +N233R +Q249R +270AGVF
R209P +T231R +N233R
N33Q +N94K +D96L +T231R +N233R +Q249R +270PGLPKRV
N33Q +N94K +D96L +T231R +N233R +Q249R
N33Q +D96S +T231R +N233R +Q249R
N33Q +D96S +V228I +T231R +N233R +Q249R
E1A +N33Q +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270PGLPKRV
N33Q +S83T +E87K +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270PGLPKRV
N33Q +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270PGLPKRV
T231R +N233R +270CP
T231R +N233R +270RE
N33Q +E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R +270PGLPKRV
D62A +S83T +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R
R84W +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270SPG
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270VVVP
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270LLASSGRGGHHR
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270VTT
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270VLQ
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270TST
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270LRI
V60G +D62E +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
G91A +D96W +E99K +T231R +N233R +G263Q +L264A +I265T +G266S +T267A +L269N +270AGGFS

아미노산 변형의 명명

돌연변이를 정의하기 위하여 본원에 사용된 명명법은 본질적으로 90/05249에 개시된 대로이다. 그러므로, T231R은 위치 231에서 T의 R로의 치환을 나타낸다. PGL 또는 270P + 271G + 272L은 C-말단(L269)에 부착된 펩티드 첨가 PGL을 나타낸다.

아미노산 그룹핑

본 명세서에서, 아미노산은 본 발명의 세계의 일반적인 pH 10에서 그들의

전하에 따라서 음으로 하전, 양으로 하전 또는 전기적으로 중성으로 분류된다. 그러므로, 음성 아미노산은 E, D, C(시스테인) 및 Y, 특히 E 및 D이다. 양성 아미노산은 R, K 및 H, 특히 R 및 K이다. 이황화 결합의 부분을 형성하는 경우에 중성 아미노산은 G, A, V, L, I, P, F, W, S, T, M, N, Q 및 C이다. 같은 기(음성, 양성 또는 중성)로 다른 아미노산의 치환은 보존성 치환이라고 한다.

중성 아미노산은 소수성(이황화결합의 부분으로서 G,A,V,L,I,P,F,W 및 C) 및 친수성(S,T,M,N,Q)로 나누어진다.

아미노산 동일성

본 발명의 리파제 변이체는 리포라제와 적어도 90% (바람직하게는 95% 이상 또는 98% 이상)의 아미노산 동일을 가진다.

동일성의 정도는 폴리펩티드 서열 비교를 위해 GAP 생성 패널티 3.0 과 GAP 신장 패널티 0.1 셋팅을 가진 GAP 를 사용하여, GCG 프로그램 패키지 (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45)로 제공된 GAP 와 같은 당업계에 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 적당하게 결정될 수 있다.

DNA 서열, 발현 벡터, 숙주 세포, 리파제 생산

본 발명은 본 발명의 리파제를 암호화하는 DNA 서열, DNA 서열을 함유하는 발현 벡터, 및 DNA 서열 또는 발현 벡터를 포함하는 형질전환된 숙주세포를 제공한

다. 이것은 당업계에서 공지된 방법에 의해 얻을 수 있다.

본 발명은 또한 리파제 생산에 기여하는 조건으로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 결과적인 육즙으로부터 리파제를 회수하는 단계에 의해서 리파제를 생산하는 방법을 제공한다. 방법은 당업계에서 공지된 원칙에 따라서 수행될 수 있다.

세제 첨가제

본 발명에 따라서, 리파제는 세제 조성물의 전형적인 첨가제로서 사용될 수 있다. 첨가제는 비-더스팅 과립화, 안정화 액체, 슬러리 또는 보호 효소로 용이하게 제제된다. 첨가제는 당업계에 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

세제 조성물

본 발명의 세제 조성물은 예를 들어, 세탁 첨가 조성물 및 얼룩진 직물의 선처리에 사용하기 적합한 조성물, 직물 연화 조성물에 첨가된 린스, 및 장치 및 식기세척기를 클린징하기 위한 일반적인 가정제품 경표면에 사용되는 조성물을 포함하여 손세탁 및 기계 세탁 세제로서 제제될 수 있다.

본 발명에 따른 세제 조성물은 본 발명의 리파제 및 계면활성제를 포함한다. 추가적으로, 그것은 빌더, 다른 효소, 비누거품 억제제, 연화제, 염료-전이 저해제 및 종래에 세제에 사용되던 얼룩-현탁제, 얼룩-해리제, 광증백제, 연마제, 살충제, 변색 억제제, 착색제, 및/또는 캡슐화 또는 비-캡슐화 향료를 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 세제 조성물은, 액체, 페이스트, 젤, 바 또는 과립 형태일 수 있다. pH(사용 농도에서 수성 용액에서 측정)는 예를 들어, 7-11의 범위, 특히

9-11 의 범위로 일반적으로 중성 또는 알칼리일 것이다. 본 발명에 따른 과립 조성 물은 또한 "컴팩트형"으로 존재할 수 있는데, 이는 종래의 과립 세제보다 상대적으로 높은 밀도인 500 내지 950 g/l 을 가질 수 있는 것이다.

본 발명의 라파제, 또는 선택적으로 세제 조성물에 첨가된 다른 효소는 일반적으로 세제 조성물의 0.00001 중량 % 내지 2 중량 % 의 효소 단백질 수준에서, 바람직하게는 조성물의 0.00001 중량 % 내지 1 중량 % 의 효소 단백질 수준에서, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량 % 내지 0.5 중량 % 의 효소 단백질 수준에서, 더욱 더 바람직하게는 조성물의 0.01 중량 % 내지 0.2 중량 % 의 효소 단백질 수준에서 세제 조성물에 섞인다.

본 발명의 세제 조성물은 세제의 그램 당 10-50,000 LU, 예를 들어, 100-1000 LU/g 와 같이 바람직하게는 20-5,000 LU/g 에 해당하는 양으로 리파제를 포함 할 수 있다. 세제는 물에 용해되어 세척액의 리터 당 25-15,000 LU, 예를 들어, 300-2000 LU/l 와 같이 바람직하게는 100-5000 LU/l 에 해당하는 양으로 지방분해 효소를 포함하는 세척액을 생산할 수 있다. 리파제 단백질의 양은 세제의 그램당 0.001-10 mg 또는 세척액의 리터당 0.001-100 mg 일 수 있다.

더욱 구체적으로는, 본 발명의 리파제는 WO 97/04079, WO 97/07202, WO 97/41212, PCT/DK WO 98/08939 및 WO 97/43375 에 개시된 세제 조성물에 포함될 수 있다.

계면 활성제

계면활성제는 비이온, 음이온, 양이온, 양쪽성, 및/또는 쌍성이온 계면활성

제를 포함할 수 있다. 상기에 개시된 대로, 본 발명의 리파제 변이체는 70-100 중량 % 의 음이온 계면활성제 및 0-30 중량 % 의 비이온, 특히 80-100 % 의 음이온 계면활성제 및 0-20 % 의 비이온을 가지는 음이온 및 비이온 계면활성제의 조합으로 구성되는 세제에 특히 적합하다. 더 개시된 대로, 본 발명의 어떤 바람직한 리파제는 또한 40-70 % 음이온 및 30-60 % 비이온 계면활성제를 포함하는 세제에 또한 적합하다.

계면활성제는 예를 들어, 1 중량 % 내지 40 중량 %, 구체적으로는 10 중량 % 내지 40 중량 %, 바람직하게는 약 3 중량 % 내지 약 20 중량 % 와 같이 0.1 중량 % 내지 60 중량 % 의 수준에서 일반적으로 존재한다. 계면활성제의 어떤 예는 하기로 개시된다.

음이온 계면활성제

바람직한 음이온 계면활성제는 알킬 술페이트, 알킬 에톡시 술페이트, 선형 알킬 벤젠 술포네이트 및 그것의 혼합물을 포함한다.

알킬 술페이트 계면활성제는 식 RO_nSO₃M 의 수용성 염 또는 산이고, 여기에서 R은 바람직하게는 C₁₀-C₂₄ 히드로카르빌, 바람직하게는 C₁₀-C₂₀ 알킬 성분을 가지는 알킬 또는 히드록시알킬, 더욱 바람직하게는 C₁₂-C₁₈ 알킬 또는 히드록시알킬이며, M은 H 또는 예를 들어, 알칼리 금속 양이온(예를 들어, 나트륨, 칼륨, 리튬), 또는 암모늄 또는 치환 암모늄과 같은 양이온이다.

알킬벤젠 술포네이트는 적당한, 특히 선형(직쇄) 알킬 벤젠 술포네이트(LAS)

이고, 여기에서 알킬기는 바람직하게는 10 내지 18 개의 탄소 원자를 포함한다.

적당한 음이온 계면활성제는 식 $R_0(A)_mSO_3M$ 의 수용성 염 또는 산인 알킬 알

콕실화 술페이트를 포함하고, 여기에서 R은 $C_{10}-C_{24}$ 알킬 성분을 가지는 비치환

$C_{10}-C_{24}$ 알킬 또는 히드록시알킬기, 바람직하게는 $C_{10}-C_{20}$ 알킬 또는 히드록시알킬,

더욱 바람직하게는 $C_{12}-C_{18}$ 알킬 또는 히드록시알킬이고, A는 에톡시 또는 프로포시

단위이며, m은 0 보다 더 크고, 전형적으로 약 0.5 내지 약 6, 더욱 바람직하게는

약 0.5 내지 약 3이며, M은 H 또는 예를 들어, 금속 양이온(예를 들어, 나트륨,

칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘등), 또는 암모늄 또는 치환 암모늄 양이온일 수 있다.

본원에서 알킬 에톡실화 술페이트뿐만 아니라 알킬 프로포실화 술페이트도 기대된다.

치환 암모늄 양이온의 특정예는 메틸-, 디메틸, 트리메틸-암모늄 양이온 및 4

메틸 암모늄과 같은 4 차 암모늄 양이온 및 디메틸 피페르디늄 양이온 및 에틸아

민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 그것의 혼합물등과 같은 알킬아민으로부터 유래된

것을 포함한다.

다른 음이온 계면활성제는 염(예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 및 모노-,

디- 와 같은 치환 암모늄 염 및 트리에탄올아민염 포함) 비누, C_8-C_{22} 제 1 차 또는

제 2 차 알칸술포네이트, C_8-C_{24} 올레핀술포네이트, 알칼리 토양 금속 시트레이트의

열분해 산물의 술폰화에 의해 준비된 술폰화 폴리카르복시산을 포함한다.

비이온 계면활성제

계면활성제는 알킬 폐놀의 폴리알킬렌 옥사이드(예를 들어, 폴리에틸렌 옥사이드)축합물을 포함할 수 있다. 알킬기는 직쇄 또는 분쇄로 약 6 내지 약 14 탄소 원자를 포함할 수 있다. 에틸렌 옥사이드는 알킬 폐놀의 몰당 약 2 내지 약 25 몰과 동량으로 존재할 수 있다.

계면활성제는 또한 약 1 내지 약 25 몰의 에틸렌 옥사이드를 가지는 제 1 차 및 제 2 차 양쪽성 알콜의 축합물을 포함할 수 있다. 양쪽성 알콜의 알킬 사슬은 직쇄 또는 분쇄일 수 있고, 일반적으로 약 8 내지 약 22 탄소 원자를 포함한다.

더욱이, 비이온 계면활성제는 알킬 폐놀의 폴리에틸렌 옥사이드 축합물, 약 1 내지 약 25 몰의 에틸렌 옥사이드를 가지는 제 1 차 및 제 2 차 양쪽성 알콜의 축합물, 알킬폴리사카라이드, 및 그것의 혼합물을 포함할 수 있다. 가장 바람직한 것은 3 내지 15 에톡시기를 가지는 C_8-C_{14} 알킬 폐놀 에톡실레이트, 및 2 내지 10 에톡시기를 가지는 C_8-C_{18} 알콜 에톡실레이트(바람직하게는 평균 C_{10}), 및 그것의 혼합물이다.

바람직한 비이온 계면활성제는 알콜 에톡실레이트, 알콜 폐놀 에톡실레이트, 폴리히드록시 지방산 아미드, 알킬 폴리글루코사이드 및 그것의 혼합물이다.

【실시예】

음이온 계면활성제의 다양한 투여량에서 제 1 급의 세척 성능

본 발명에 따라서 하기의 5 개의 변이체를 제조했고 3 가지 형태의 얼룩진

견본으로 시험했고, 비교를 위해 모 리파제를 포함했다.

T231R +N233R
G91A +D96W +E99K +G263Q +L264A +I265T +G266D +T267A +L269N
+270AGGF5WRYYRSAESVDKRATMTDAELEKLNSYVQMDKEYVKNNQARS
R209P +T231R +N233R
N33Q +D96S +T231R +N233R +Q249R
E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R

음이온 계면활성제의 고 함량을 가진 상업적인 US 세제는 가열되어 이미 존재하는 효소를 불활성화시켰고, Tergot-o-meter™ 실험실 세탁기에서 1.4 g/l로 사용되었다. 물 경도는 6 ° dH (Ca:Mg 2:1)이었고, 세척 조건은 30 °C, 12 분동안 1 순환 다음에 여과지에서 하룻밤동안 건조시켰다. 리파제 변이체를 투여량 6400 및 12800 LU/I로 첨가했다. 이중 결정을 2 개의 별도의 세척으로 행했다(같은 TOM).

하기의 3 가지 형태의 직물 견본이 시험되었다: 새것으로 준비된 코튼 스타일 400 상의 Lard/Sudan 레드; 폴리에스테르/코튼상의 wfk 20-LS 립스틱; 및 코튼 상의 wfk 10-LS 립스틱. 얼룩 제거를 첫번째 세척 순환후에 460 nm에서 차도를 측정함으로써 평가했고, 결과를 무효소 블랭크의 경감을 제외시킴으로써 ΔR 로 표현했다.

결과는 각 투여량에서 각 변이체가 각각의 형태의 얼룩진 견본(5 내지 13의 ΔR)에서 개선된 제 1 급의 세척 성능을 보인 반면에, 같은 조건에서 모 효소는 본질적으로 어떤 효과도 없었다($\Delta R=0 \pm 2$).

【청구의 범위】

【청구항 1】

- a) *Humicola lanuginosa* 균주 DSM 4109로부터 유래된 야생형 리파제와 적어도 90 % 동일성을 가지고;
- b) 야생형 리파제와 비교할 때, E1 또는 Q249의 15 Å의 범위내에서 3 차원 구조의 표면상에 전기적으로 중성 또는 음으로 하전된 아미노산을 양으로 하전된 아미노산으로의 치환을 포함하며;
- c) C-말단에 펩티드 첨가를 포함하며; 및/또는
- d) 하기의 제한:
- i) 상기 야생형 리파제의 위치 E210에서 음성 아미노산을 포함하는 것;
 - ii) 상기 야생형 리파제의 위치 90-101에 해당하는 영역에서 음으로 하전된 아미노산을 포함하는 것;
 - iii) 상기 야생형 리파제에 해당하는 위치에서 중성 또는 음성 아미노산을 포함하고 및/또는 상기 야생형 리파제의 위치 90-101에 해당하는 영역에서 음성 또는 중성 순전하를 가지는 것을 충족시키는 아미노산 서열을 가지는 리파제 폴리펩티드.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 치환은 E1 또는 Q249의 10 Å 내인 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 치환은 E1 의 15 A 내(바람직하게는 10 A)인 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 4】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 2-4(바람직하게는 2)개의 상기 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 5】

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, E1 의 10 A 내의 전기적으로 중성 또는 음으로 하전된 아미노산을 R 로 치환하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 6】

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 S3, S224, P229, T231, N233, D234 또는 T244 를 양으로 하전된 아미노산, 바람직하게는 R 로 치환하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 7】

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 첨가는 1-5 개의 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 8】

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 첨가는 전기적으로 중성(바람직하게는 소수성)아미노산으로 구성되고, 가장 바람직하게는 PGL 또는 PG 인 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 9】

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 첨가는 중성(바람직 하게는 소수성)아미노산 및 C로 구성되고, 리파제는 C로 치환된 아미노산을 더 포함하여 C 펩티드 첨가와 이황화 결합을 형성하는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 리파제 N94, D96 및 E99의 적어도 2개의 위치에서 음 전하 또는 본래의 전하를 가지는 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 11】

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 치환 G91A, N94D/E/K/R, D96E/I/L/N/S/W, E99N/Q/K/R/H, N101S, R209P/S 또는 Q249R/K/H를 포함하는 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 12】

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 다음 세트의 치환:

- a) G91G/A/S/T + N94(중성 또는 음성) + D96D/E/C/Y + E99E/D/C/Y,
 - b) G91G/A/S/T + N94(중성 또는 음성) + D96D/E/C/Y + E99N + N101S,
 - c) G91G/A/S/T + N94R/K/H + D96D/E/C/Y + E99E/D/C/Y,
 - d) G91G/A/S/T + N94(중성 또는 음성) + D96(중성 또는 양성) + E99E/D/C/Y,
- 또는
- e) G91G/A/S/T + N94(중성 또는 음성) + D96D/E/C/Y + E99(중성 또는 양성)

중 어느 하나를 포함하며, 선택적으로 Q24R/K/H 및/또는 K98X 와 조합된 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 13】

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 다음 세트의 치환:

a) E99R/K/H + Q24R/K/H,

b) N94R/K/H + Q24R/K/H, 또는

c) D96(중성 또는 양성) + Q249R/K/H 중 어느 하나를 포함하며, 선택적으로 R209(중성 또는 음성)와 조합된 것을 특징으로 하는 리파제.

【청구항 14】

계면활성제 및 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 리파제를 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서, 계면활성제는 총 계면활성제의 70 중량 % 이상의 양으로 음이온 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

【청구항 16】

제 14 항에 있어서, 계면활성제는 총 계면활성제의 40-70 중량 %의 양으로 음이온 계면활성제 및 30-60 중량 %의 양으로 비이온 계면활성제를 포함하며, 리파제는 제 8 항 또는 제 9 항의 리파제인 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

【청구항 17】

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 10-40 중량 % 계면활성제,

바람직하게는 40-70 % 빌더를 포함하며, 바람직하게는 0.5-5g/l 로 물에서 용해될 때 pH 9-11 을 가지는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

【청구항 18】

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 리파제를 암호화하는 것을 특징으로 하는 DNA 서열.

【청구항 19】

제 18 항의 DNA 서열을 함유하는 것을 특징으로 하는 발현 백터.

【청구항 20】

제 18 항의 DNA 서열 또는 제 19 항의 발현 백터를 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 숙주 세포.

【청구항 21】

리파제의 생산에 기여하는 조건하에서 제 20 항의 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 결과적인 육즙으로부터 리파제를 회수하는 단계를 포함하는 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 리파제를 생산하는 방법.

【요약서】

【요약】

어떤 리포라제 변이체(야생형 *Humicola lanuginosa* 리파제)는 세계 용액에서 특히 양호한 제 1 급의 세척 성능을 가진다. 변이체는 3 차원 구조의 N-말단 근처에서 양성 아미노산으로의 하나 이상의 치환을 포함하여야만 한다. 변이체는 C-말단에 펩티드 첨가를 더 포함해야만 하고/또는 위치 90-101 및 210에서 전기적으로 하전된 아미노산에 대한 어떤 제한을 충족해야만 한다.

【색인어】

리파제, 리포라제 변이체, 세계 조성물

TRANSLATION

[Document] Submission of Paper to be attached to Electronic Filing Request

[To] Korean Intellectual Property Office

[Filing Date] September 25, 2001

[Applicant]

[Name] Novozymes A/S

[Applicant's Code No.] 5-2000-057136-1

[Attorney]

[Name] J. S. Jeong

[Code No.] 9-1998-000519-0

[General Power of Attorney Registration No.] 2001-034547-7

[Attorney]

[Name] J. H. Park

[Code No.] 9-2000-000056-3

[General Power of Attorney Registration No.] 2000-071673-5

[Description of the Case]

[No. of Receipt] 1-1-01-0244093-18

[Date of Receipt] September 24, 2001

[Application No.] 10-2001-7012115

[Application Filing Date] September 24, 2001

[Document to be Submitted] Copy of Notification of the Recording of a Change

[Purport] We are filing this paper as above pursuant to Article 9 (5) of the Enforcement
Regulation of the Korean Patent Law.

Attorney

J. S. Jeong

Attorney

J. H. Park

[Attached Document]

1. Copy of Notification of the Recording of a Change

1 copy

(Form PCT/IB/306)



방 식 심 사 란	당 당	심 사 관

【서류명】 전자문서 첨부서류 제출서

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2001.09.25

【출원인】

【명칭】 노보자임스 에이/에스

【출원인코드】 5-2000-057136-1

【대리인】

【성명】 정진상

【대리인코드】 9-1998-000519-0

【포괄위임등록번호】 2001-034547-7

【대리인】

【성명】 박종혁

【대리인코드】 9-2000-000056-3

【포괄위임등록번호】 2000-071673-5

【사건의 표시】

【접수번호】 1-1-01-0244093-18

【접수일자】 2001.09.24

【출원번호】 10-2001-7012115

【출원일자】 2001.09.24

【제출할 서류】 출원인명의변경신고서

【취지】 특허법시행규칙 제9조의5· 실용신안법시행규칙 제27조· 의장법시행규칙 제28조 및 상표법시행규칙 제36조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

대리인

정진상 (인)

대리인

박종혁 (인)

【첨부서류】 1.기타첨부서류_1통[출원인명의변경신고서]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.